



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 41 43 214 A 1

(51) Int. Cl. 5:
C 07 K 15/28
A 61 K 39/395

(30) Innere Priorität: (32) (33) (31)

25.07.91 DE 41 24 759.0

(71) Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

(74) Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

(72) Erfinder:

Weidle, Ulrich, Dr., 8000 München, DE; Scheuer,
Werner, Dr., 8122 Penzberg, DE; Kaluza, Brigitte, Dr.,
8173 Bad Heilbrunn, DE; Riethmüller, Gert, Prof. Dr.,
8000 München, DE

(54) Synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, die
(a) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und
(b) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper enthält sowie ein auf dieser Antikörperzusammensetzung basierendes Arzneimittel.

DE 41 43 214 A 1

DE 41 43 214 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, die zwei Antikörper gegen verschiedene T-Zell-Oberflächenmarker enthält.

In der Transplantationschirurgie sind in den letzten zehn Jahren deutliche Fortschritte erzielt worden. Insbesondere haben sich die therapeutischen Maßnahmen, welche die Funktion und die Überlebenszeit des transplantierten Organs sicherstellen sollen, wesentlich verbessert. Trotz dieser positiven Entwicklung gewähren die heute etablierten Maßnahmen auch für einen begrenzten Zeitraum keinen hundertprozentigen Transplantationserfolg. Dies liegt zum einen an der Qualität des zu transplantierenden Organs und der Operationsstechnik, zum großen Teil jedoch daran, daß die Spenderorgane von einem genetisch differenten Individuum stammen. Diese genetische Nichtkompatibilität zwischen Empfänger und Spender (allogenes Transplantat) verursacht im Empfänger eine Immunreaktion gegen Major Histocompatibility Complex (MHC)-kodierte Oberflächenantigene des Transplantats. Zur Verhinderung dieser Abstoßungsreaktion, die sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann, muß die immunologische Reaktivität des Empfängers gezielt durch eine immunsuppressive Therapie unterdrückt werden. Alle heute in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva bewirken jedoch eine mehr oder weniger unspezifische Immunsuppression. Die daraus resultierenden Nebenwirkungen sind zum Teil gravierend.

So wirkt das Purinanalogon Azathioprin (Drug Evaluation, 6th Edition American Medical Association 1151 (1986)) als Antimetabolit auf alle proliferierenden Zellen. Nachteile dieser Substanz sind jedoch ihre potentielle Lebertoxizität und die Induktion einer Knochenmarksdepression. Dadurch kommt es zur Verminderung aller Blutzellen.

Glucokortikoide gehören zu den nichtcytotoxischen Immunsuppressiva. Sie führen jedoch insbesondere bei einer längeren Therapiedauer zu nicht tolerablen Nebenwirkungen (Wachstumsstörungen, Hypertonie, Herzinsuffizienz), die zur Absetzung der Medikation zwingen.

Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) und Cyclosporin besitzen eine höhere Spezifität als die zuvor genannten Substanzen, wirken jedoch auf die Gesamtheit des Immunsystems und erhöhen durch diese generelle Immunsuppression das Risiko von Virus- und Bakterieninfektionen. Weitere Nachteile sind, daß ALG aufgrund seines Sensibilisierungspotentials nur zeitlich befristet verabreicht werden kann. Die Behandlung mit Cyclosporin kann zu einer erhöhten Tumorinzidenz führen.

Akute Abstoßungskrisen bei Organtransplantationen konnten auch erfolgreich mit Anti-T-Zell-Antikörpern behandelt werden (Cosimi AB: Transplant.Proc. 15 (1983), S. 1889; Kreis, H. et al., Transplant.Proc. 17 (1985), S. 1315; Krikma, R.L. et al., Transplantation 36 (1983), S. 620). T-Zellen (T-Lymphozyten) werden in CD4-positive und CD8-positive Zellen unterteilt. CD4 und CD8 sind Oberflächenantigene auf diesen Zellen. CD8-positive T-Zellen interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor in Kontext mit MHC Klasse I Molekülen (Killerzellen). CD4-positive T-Zellen interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor in Kontext mit MHC Klasse II Molekülen auf entsprechenden Rezipientenzellen (Helfer-T-Zellen, Suppressor T-Zellen).

Es wurde gezeigt, daß sowohl mit Anti-CD4-Antikör-

pern als auch mit Anti-CD8-Antikörpern die Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen verhindert werden kann (vgl. z. B. Benjamin, R.J. and Waldmann, H.: Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy, Nature 320 (1986), S. 449; Benjamin, R.J., Cobbold, S.P., Clark, M.P. and Waldmann, H.: Tolerance to rat monoclonal antibodies. Implications for serotherapy. J.Exp.Med. 163 (1986), S. 1539; Cobbold, S.P., Martin, G., Quin S.X. and Waldmann, H.: Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. Nature 323 (1986), S. 164; Quin S.X., Cobbold, S.P., Tighe, H., Benjamin, R. and Waldmann, H.: CD4 Mab pairs for immunosuppression and tolerance induction. Eur.J.Immunol. 18 (1987) S. 495).

Der Nachteil bei der immunsuppressiven Behandlung mit derartigen Antikörpern ist jedoch, daß diese in einer relativ großen Menge eingesetzt werden müssen. Damit kann es selbst bei chimärisierten Antikörpern zu heftigen Immunreaktionen kommen.

Die EP-A 02 40 344 offenbart in Beispiel 5 (Spalte 8) eine Kombination von Anti-CD4-MAKS mit Anti-IL2Ra (CD25)-MAKS zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen. Eine vollständige Hemmung wird jedoch nur bei Kombination mit einem dritten MAK gegen CD8 erreicht. Der in der Kombination als Anti-IL2Ra-MAK verwendete Antikörper YCTLD45.1 zeigt für sich alleine keine nennenswerte Hemmung der Immunreaktion. Es wird jedoch nicht offenbart, welche Eigenschaften die in Kombination verwendbaren Antikörper besitzen müssen, damit generell eine vollständige Hemmung erwartet werden kann.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein immunsuppressives Mittel zur Verfügung zu stellen, welches zuverlässig die Abstoßungsreaktion gegen Transplantate unterdrücken kann und nur in geringen Dosen verabreicht werden muß.

Gelöst wird die erfundungsgemäße Aufgabe durch eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

- a) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und
- b) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2Ra- oder Anti-IL2Rβ-Antikörper enthält,

wobei ein stark inhibierender Antikörper bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml die allogen induzierte Lymphozytenproliferation in Abwesenheit anderer Antikörper zu mindestens 40% hemmt.

Wenn es sich bei dem Antikörper (b) um einen Anti-IL2Ra-Antikörper handelt, dann liegt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) vorzugsweise zwischen 1:10 und 10:1. Wenn es sich dagegen bei dem Antikörper (b) um einen Anti-IL2Rβ-Antikörper handelt, dann liegt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) vorzugsweise zwischen 1:1000 und 10:1. Die Kombination Anti-CD4-MAK und Anti-IL2Ra-MAK ist erfundungsgemäß bevorzugt.

Eine Voraussetzung für den synergistischen Effekt bei der Kombination von monoklonalen Anti-CD4-bzw. Anti-IL2-Rezeptor-Antikörpern ist, daß jeder dieser Antikörper bereits für sich alleine eine immunsuppressive, d. h. die Lymphozytenproliferation stark inhibierende Wirkung zeigen muß. Diese "stark inhibierende" Wirkung im Sinne der vorliegenden Erfindung zeigt sich

darin, daß der betreffende Antikörper bereits alleine die allogen induzierte Lymphozytenproliferation (MLR) bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml zu mindestens 40% hemmt. Antikörper, die in einer Konzentration von 10 000 ng/ml bei der MLR keine Hemmwirkung oder eine Hemmwirkung von weniger als 40% zeigen, sind daher als Bestandteile einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung im allgemeinen nicht geeignet.

Es wurde gefunden, daß die Kombination eines stark inhibierenden monoklonalen Antikörpers gegen die CD4-Struktur mit einem stark inhibierenden monoklonalen Antikörper gegen die α -Kette des IL2-Rezeptors (Anti-IL2R α -Antikörper) oder die β -Kette des IL2-Rezeptors (Anti-IL2R β -Antikörper) überraschenderweise die Inhibition der Proliferation der T-Helferzellen synergistisch steigert, so daß auf diese Weise Transplantationsabstoßungen vermieden werden. Es zeigt sich, daß bei einem üblicherweise verwendeten *in vitro* Testsystem für die immunologische Histokompatibilität zweier Individuen (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR, Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell, B.B., Shiigi S.M. eds. WH Freeman and Company, San Francisco 1980) die gleichzeitige Zugabe zweier monoklonaler Antikörper (Anti-CD4, Anti-IL-2 Rezeptor) synergistisch die Eymphozytenproliferation hemmt. Die wirkliche Dosis dieser Antikörperkombination ist damit überraschenderweise wesentlich geringer als die wirkliche Dosis der Antikörper, wenn sie einzeln eingesetzt werden. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, daß bei der Kombination von Anti-IL2R α -Antikörpern mit Anti-CD4-Antikörpern eine bis zu 96%ige Hemmung der MLR erzielt werden kann. Bei Verwendung von Anti-IL2R α -Antikörpern oder Anti-CD4-Antikörpern allein wird dagegen selbst bei Konzentrationen von 30 μ g/ml keine stärkere Hemmung als 70% erreicht. Bei der Kombination von Anti-IL2R β -Antikörpern mit Anti-CD4-Antikörpern kann ebenfalls überraschenderweise eine bis zu 96%ige Hemmung der MLR erzielt werden.

Der erfindungsgemäße und überraschende Synergismus wird nur dann festgestellt, wenn ein für sich alleine bereits stark inhibierender Anti-IL2R α -oder Anti-IL2R β -MAK in Kombination mit einem Anti-CD4-MAK verwendet wird. Verwendet man hingegen beispielsweise einen nicht bzw. nur schwach inhibierenden Anti-IL2R α -MAK, so wurde in Kombination mit einem für sich alleine bereits stark inhibierenden Anti-CD4-MAK keine verstärkte suppressive Wirkung gegenüber der alleinigen Verwendung des Anti-CD4-MAK festgestellt.

Bei einer Kombination von Anti-CD4-MAK und Anti-IL2R α -MAK werden für einen optimalen synergistischen Effekt vorzugsweise die beiden Antikörper (a) und (b) in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 10:1 verwendet. Besonders bevorzugt beträgt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:5 bis 5:1, am meisten bevorzugt von 3:10 bis 3:1. Bei Verwendung der Kombination Anti-CD4-MAK und Anti-IL2R β -MAK wird vorzugsweise ein molares Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:1000 bis 10:1 gewählt. Die erfindungsgemäße Antikörperzusammensetzung kann sowohl einen als auch mehrere Anti-CD4-Antikörper und sowohl einen als auch mehrere Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper enthalten, wobei sich bei Verwendung von mehreren Antikörpern eine Spezifität das molare Verhältnis immer jeweils auf die Summe aller Antikörper einer Spezifität bezieht.

Weiterhin wurde festgestellt, daß für die erfindungs-

gemäße Verwendung die Anwendung der beiden Antikörper zwar gemeinsam, aber nicht unbedingt gleichzeitig erfolgen muß, um den synergistischen Effekt zu zeigen. Unter dem Begriff "gemeinsamen Anwendung" ist im Sinne der vorliegenden Erfindung zu verstehen, daß auch eine gewisse zeitliche Versetzung bei der Verabreichung beider Antikörper toleriert werden kann. Es ist jedoch erforderlich, daß bei Verabreichung des zweiten Antikörpers die Wirksamkeit des zuerst verabreichten Antikörpers noch nicht deutlich nachgelassen haben darf. In der Praxis kann eine derartige in Frage kommende zeitliche Versetzung etwa bis zu 12 Stunden betragen.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Antikörperkombination ist ihre hohe Spezifität. Da Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper insbesondere an die aktivierte T-Symphozyten binden und lediglich die Anti-CD4-Antikörper an die Gesamtheit aller T-Helferzellen binden, wird durch die erfindungsgemäß Kombination dieser Antikörper in den erfindungsgemäß geringen Mengen die allgemeine Immunreaktion nur unwesentlich unterdrückt.

Die als Komponenten der erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzung geeigneten Antikörper können murine, humane, chimärische oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sein. Vorzugsweise verwendet man humane, chimärische oder humanisierte Antikörper oder derartige Antikörperfragmente, da auf diese Weise die Möglichkeit einer Immunreaktion gegen die verabreichten Antikörper möglichst gering gehalten wird. Chimärische oder humanisierte Antikörper im Sinne der vorliegenden Erfindung sind nicht-human Antikörper z. B. murinen Ursprungs, bei denen mittels bekannter gentechnologischer Methoden murine Sequenzen durch humane Sequenzen ersetzt worden sind. Bei den chimärischen Antikörpern wird dabei nur die konstante Region des Antikörpers durch eine entsprechende humane Region ersetzt, während bei humanisierten Antikörpern die CDR-Regionen (complementary-determining regions) von humanen V-Regionen für die leichte und die schwere Kette eines Antikörpers durch die CDR-Regionen eines murinen oder anderen Nager-Antikörpers ausgetauscht werden können, so daß der humanisierte Antikörper bis auf die CDR-Regionen einem humanen Antikörper entspricht. Ebenfalls geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren sind Antikörperfragmente, z. B. Fab- oder F(ab)₂-Antikörperfragmente, die nach Standardmethoden gewonnen werden können.

Eine genaue Beschreibung von geeigneten Anti-IL2R α -Antikörpern findet man in der DE 40 28 955.9. Anti-CD4-Antikörper sind in Eur.J.Immunol. 18 (1987) 495 beschrieben. Eine Beschreibung von geeigneten Anti-IL2R β -Antikörpern findet man in Takeshita, T., Goto, Y., Tada, K., Nagata, K., Asao, H., Sugamura, K.: J.Exp.Med. 169 (1989) 1323; Tsudo, M., Kitamura, F., Mijasaka, M.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 1982 und Niguma, T., Sakagami, K., Kawamura, T., Haisa, M., Fujiwara, T., Kusaka, S., Uda, M., Orita, K.: Transplantation 52 (1991) 296 – 302.

Besonders geeignet ist eine Kombination von Anti-CD4- und Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörpern, deren Sequenzen für die variablen Regionen der leichten bzw. schweren Ketten in den beiliegenden Sequenzprotokollen beschrieben sind. SEQ ID NO. 1 und 2 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1, SEQ ID NO. 3 und 4 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-

CD4-Antikörpers MT 3.10, SEQ ID NO. 5 und 6 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179. SEQ ID No. 9 und 10 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-ILR β -Antikörpers A41. Während sich die zuvor genannten Antikörper zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung eignen, wurde dagegen festgestellt, daß der alleine nur schwach inhibitorisch wirkende Anti-ILR α -Antikörper M-215 (SEQ ID. 7 und 8) in Kombination mit einem stark inhibierenden Anti-CD4-Antikörper keinen synergistischen Effekt zeigt. Geeignete konstante Regionen (murin oder human) für diese Antikörper sind beschrieben in : Sequences of proteins of immunological interest; E. Kabat, T. Wu, M. Reid-Miller, H. Perry and K. Gottesman, U.S. Department of Health and Human Services, 1987, p. 282 – 325. Die Fusion der Gene für die konstanten Regionen mit den Genen für die variablen Regionen kann mittels Standard-Klonierungstechniken der Molekularbiologie erfolgen.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, das aus Komponenten (1) und (2) besteht, wobei die beiden Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert sein können, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Komponente (1) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IE2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen. Bei Verwendung eines Anti-IL2R α -Antikörpers als Wirkstoff der Komponente (2) ist das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel vorzugsweise von 1:10 bis 10:1. Besonders bevorzugt beträgt das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 1:5 bis 5:1, am meisten bevorzugt von 3:10 bis 3:1. Verwendet man hingegen einen Anti-IL2R β -Antikörper als Wirkstoff der Komponente (2), dann ist das Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) vorzugsweise von 1:1000 bis 10:1.

Wie bereits oben ausgeführt, sind die beiden Komponenten des erfindungsgemäßen Arzneimittels gemeinsam zu verabreichen, wobei der Begriff "gemeinsam" jedoch nicht unbedingt gleichzeitig bedeuten muß. Daher ist klar, daß die beiden Komponenten des erfindungsgemäßen Arzneimittels getrennt formuliert sein können. Die Formulierung der Antikörper erfolgt mittels Standardmethoden, z. B. in intravenös verabreichtbaren physiologischen Lösungen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörperszammensetzung oder des erfindungsgemäßen Arzneimittels bei einer immunsuppressiven Therapie, insbesondere bei einer Therapie zur Unterdrückung einer Immunreaktion nach Organ- oder Gewebetransplantationen und Autoimmunerkrankungen.

Bei einem derartigen Behandlungsverfahren wird ein erfindungsgemäßes Arzneimittel verabreicht, das die Kombination eines Anti-CD4- und eines Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörpers enthält. Bei einem derartigen therapeutischen Verfahren ist es überraschenderweise möglich, die Menge der verwendeten Antikörper gegenüber dem getrennten Einsatz der MAKs um den Faktor 10 herabzusetzen. Bei den verschiedenen in vivo Transplantationsmodellen werden MAKs gegen Oberflächenstrukturen bei einer Konzentration von 1 bis

5 mg/kg Körpergewicht (täglich für 10 bis 14 Tage) eingesetzt. Bei einer erfindungsgemäßen Kombination Anti-CD4 plus Anti-IL2R α bzw. Anti-CD4 plus Anti-IL2R β könnte die effektive Dosis auf 100 bis 200 μ g/kg herabgesetzt werden.

Folgende Antikörper wurden bei der ECACC, Public Health Laboratory Service, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP 5 OJG, Großbritannien hinterlegt:

10 Anti CD4 MAK MT 15.1 unter der Bezeichnung Clone 15.1/P3/14 (ECACC 90090705),

Anti CD4 MAK MT 3.10 unter der Bezeichnung Clone 3.101/sB10 (ECACC 90090702) und

Anti IL2R α MAK 179 unter der Bezeichnung 3G10/179 (ECACC 90071905).

15 Der monoklonale Anti IL2R β -Antikörper A41 wurde unter der Bezeichnung MAK <-IL-2R> M-A23A41 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, am 30.07.1991 unter der Nr. DSM 20 ACC 2015 hinterlegt.

Die folgenden Beispiele sollen in Verbindung mit den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 10 die Erfindung weiter verdeutlichen.

25 SEQ ID NO. 1 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1,

SEQ ID NO. 2

30 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1,

SEQ ID NO. 3 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 3.10,

35 SEQ ID NO. 4 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 3.10,

40 SEQ ID NO. 5 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179,

45 SEQ ID NO. 6

zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179,

SEQ ID NO. 7

50 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK M-215,

SEQ ID NO. 8

55 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK M-215,

SEQ ID NO. 9

60 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R β -Antikörpers MAK A41 und

SEQ ID NO. 10

65 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R β -Antikörpers MAK A41.

Beispiel 1

Messung der Inhibition der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) durch Antikörper

Die Mixed Lymphocyte Reaction (gemischte Lymphozyten Kultur) basiert auf der Eigenschaft von T-Lymphozyten, nach Erkennen von Fremdantigenen in vitro verstärkt zu proliferieren. Fremdantigene können Bakterien und Viren sein, aber auch Transplantationsantigene auf fremdem Gewebe oder Zellen. Zur Induktion der T-Zell-Proliferation von durch Plasmaphorese gewonnenen peripheren Blut-Lymphozyten (PPBL) wurde die humane Lymphozyten-Linie RPMI 1788 (ATCC CLL156) verwendet. Durch Behandlung mit Mitomycin C wurde diese Zelllinie in ihrer Eigenproliferation vollständig blockiert. In der MLR proliferieren also nur die T-Lymphozyten der PPBL. Die Aktivierung der T-Lymphozyten kann durch Zugabe von immunsuppressiven Substanzen komplett inhibiert werden.

Die Durchführung der MLR erfolgt in Anlehnung an Selected Methods in Cellular Immunology Mishell B.B., Shiigi S.M. eds. WH Freeman and Company San Francisco (1980).

Medium (RPMI 1640 komplett)

440 ml RPMI 1640 (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 209 945)

50 ml fötales Kälberserum (FKS) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 471)

5 ml Glutaminlösung, 200 mmol/l (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 277)

5 ml Vitaminlösung (1%) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 307) enthaltend

1 ml Penicillin (50 000) und Streptomycin (50 mg) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 404) in RPMI 1640

Vitaminlösung (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 307):

mg/100 ml

Ca—D(+)—Pantothenat	10,0	
Cholinchlorid	10,0	
Folsäure	10,0	
meso-Inositol	20,0	
Nicotinsäureamid	10,0	
Pyridoxal · HCl	10,0	
Riboflavin	1,0	
Thiamin · HCl	10,0	

PPBL-Zellen: Aus Lymphozytenkonzentrat (gewonnen durch Plasmaphorese, Bayerisches Rotes Kreuz München) wurden die Lymphozyten durch Dichtezentrifugation mittels Lymphozyten-Trennmedium (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 295 949) gewonnen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in RPMI 1640 komplett wurde ein Zelltiter von 10^6 /ml eingestellt.

RPMI 1788-Zellen: Humane Lymphozytenlinie (ATCC CCL 156; IgM-lambda Ketten sezernierend)

RPMI 1788-Zellen (ATCC CCL 156) werden mit Mitomycin C behandelt. Dazu werden 10^7 Zellen/ml mit 50 µg Mitomycin (gelöst in 100 µl RPMI 1640 komplett) versetzt und 45 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und 2 x mit RPMI 1640 (komplett) gewaschen.

Es wird ein Zelltiter von $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Zur Durchführung der MLR werden 100 µl PPBL (10^5 -Zellen) in Medium, RPMI 1640 komplett, 100 µl RPMI 1788-Zellen (10^5 -Zellen) in Medium, RPMI 1640 komplett und 20 µl Probensubstanz (MAK 179 und/oder MAK M 15.1) in den in den Tabellen 1 bis 2b angegebenen Konzentrationen in Flachboden-Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen, Fa. Nunc) gegeben. Es wird vier Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Ausmaß der Proliferation wird durch Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNS quantifiziert. Dafür werden 0,5 µCi/Vertiefung Methyl-³H Thymidin (spezifische Aktivität 25 Ci/mmol, TRK 120, Amersham-Buchler, Braunschweig) in 25 µl Medium zugegeben. Die Zellen werden weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend werden die Zellen mit einem Inotech-Harvester (Fa. Inotech, Wohlen, Schweiz) auf Glasfiberfilterplatten geerntet. Mit dem Filter Counting System INB-384 (Inotech) wird die Radioaktivität der Filterplatten bestimmt. Aus dem Verhältnis der gemessenen Radioaktivität für einen Testansatz mit Probensubstanz zu einem Testansatz ohne Probensubstanz wird die prozentuale Inhibition, wie sie in den Tabellen 1, 2a und 2b angegeben ist, bestimmt. (Die Konzentrationsangaben in den Tabellen sind als Mengenangaben pro ml Testvolumen zu verstehen.)

Die folgende Tabelle 1 zeigt die Dosis-Wirkungskurve bei jeweils alleiniger Anwendung der monoklonalen Antikörper MAK 179 (Anti-IL2R α -Antikörper) oder MT 3.10 bzw. MT 15.1 (Anti-CD4-Antikörper) in der allogen induzierten Lymphozyten Proliferation (MLR). Aus den Werten ist ersichtlich, daß die Hemmwirkungen der einzelnen Antikörper bei einer Konzentration von ca. 300 ng/ml einen Maximalwert zwischen 60 bis 70% erreichen. Durch weitere Zugabe desselben Antikörpers bis zu einer Konzentration von 30 000 ng/ml kann die Hemmwirkung nicht mehr verbessert werden.

Tabelle 1

Hemmung der MLR in Prozent gegenüber Kontrolle

Konz. ng/ml	MAK 179	MT 3.10	MT 15.1
1	4	9	5
3	11	18	2
10	28	26	24
30	48	57	52
100	58	58	54
300	61	67	67
1000	61	68	67
3000	60	62	65
10 000	61	68	70
30 000	61	70	70

Die folgende Tabelle 2a zeigt die Inhibition der allogen induzierten Lymphozyten Proliferation (MLR) durch Kombination von MAK 179 und MT 3.10. Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch gemeinsame Anwendung beider Antikörper eine sehr deutliche Verbesserung der Hemmwirkung eintritt. Bereits bei Einsatz von jeweils 100 ng/ml der beiden Antikörper wird eine fast vollständige Inhibition der allogen induzierten Lymphozyten-Proliferation festgestellt.

9
Tabelle 2a

Konzentration in ng/ml MAK 179	MT 3.10	Inhibition %
1	—	0
10	—	23
100	—	53
—	1	0
—	10	19
—	100	43
1	1	0
10	1	14
100	1	46
1	10	29
10	10	45
100	10	74
1	100	39
10	100	69
100	100	92

Die folgende Tabelle 2b zeigt die Inhibition der allo-
gen induzierten Lymphozyten-Proliferation (MLR)
durch Kombination von MAK 179 und MT 15.1. Man
findet bereits bei Einsatz von jeweils 100 ng/ml der bei-
den Antikörper eine fast vollständige Inhibition der allo-
gen induzierten Lymphozyten-Proliferation.

Tabelle 2b

Konzentration in ng/ml MAK 179	MT 15.1	Inhibition %
1 ^{a)}	—	0
10	—	23
100	—	53
—	1	0
—	10	18
—	100	53
1	1	1
10	1	25
100	1	62
1	10	16
10	10	48
100	10	86
1	100	28
10	100	64
100	100	96

Vergleichsbeispiel

Es wurde auch die Wirkung der Kombination eines alleine nur schwach inhibierenden Anti-IL2R α -Antikörpers (M-215) mit den stark inhibitorisch wirksamen Anti-CD4-Antikörpern 3.10 bzw. 15.1 getestet. Die Testdurchführung erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3a und 3b dargestellt.

10
Tabelle 3a

Konzentration in ng/ml M-215	MT 3.10	Inhibition %
10 000	—	20
—	100	43
10 000	1	18
10 000	10	31
10 000	100	40
15		
Konzentration in ng/ml M-215	MT 15.1	Inhibition %
20 10 000	—	20
—	100	44
10 000	1	19
10 000	10	26
25 10 000	100	45

Tabelle 3b

Konzentration in ng/ml M-215	MT 15.1	Inhibition %
20 10 000	—	20
—	100	44
10 000	1	19
10 000	10	26
25 10 000	100	45

Aus den Tabellen 3a und 3b ist ersichtlich, daß eine Kombination der Antikörper M-215 und MT 3.10 bzw. 30 M-215 und MT 15.1 auch bei extrem hohen Konzentrationen keinen synergistischen Effekt zeigt.

Beispiel 2

35 Es wurde die Dosis-Wirkungskurve des alleine stark
inhibierenden Anti-IL2R β -Antikörpers A41 alleine und
in Kombination mit den bereits in Beispiel 1 getesteten
stark inhibierenden Anti-CD4-Antikörpern MT3.10 und
40 MT 15.1 untersucht. Die Testdurchführung erfolgte ge-
mäß Beispiel 1. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4a
und 4b beschrieben.

Tabelle 4a

Konzentration in ng/ml MAK A 41	MT 3.10	Inhibition %
50 100	—	11
1000	—	26
10 000	—	50
55 100	1	4
—	10	31
—	100	60
100	1	8
1000	1	32
10 000	1	60
60 100	10	48
1000	10	70
10 000	10	85
100	100	64
1000	100	76
65 10 000	100	96

Konzentration in ng/ml MAK A41	MT 15.1	Inhibititon %	
100	—	11	5
1000	—	26	
10 000	—	50	
—	1	0	10
—	10	34	
—	100	55	
100	1	27	
1000	1	39	15
10 000	1	49	
100	10	48	
1000	10	70	
10 000	10	80	
100	100	59	20
1000	100	78	
10 000	100	92	

Aus den Tabellen 4a und 4b ist ersichtlich, daß eine 25 Kombination der Antikörper A41 und MT3.10 bzw. A41 und MT15.1 eine synergistische Wirkung gegenüber einer alleinigen Verabreichung der Antikörper zeigt.

Patentansprüche

1. Synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, dadurch gekennzeichnet daß sie
 - a) mindestens einen für sich alleine bereits 35 stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und
 - b) mindestens einen für sich alleine bereits 40 stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper
 wobei ein stark inhibierender Antikörper bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml die allogen induzierte Lymphozytenproliferation in Abwesenheit anderer Antikörper zu mindestens 40% hemmt.
2. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 1, 45 dadurch gekennzeichnet, daß sie als Antikörper (b) mindestens einen Anti-IL2R α -Antikörper enthält, wobei das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:10 bis 10:1 ist.
3. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, 50 dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:5 bis 5:1 ist.
4. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, 55 dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 3:10 bis 3:1 ist.
5. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (a) die in SEQ ID NO. 1 und 2 oder die in SEQ ID NO. 3 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
6. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ ID NO. 5 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
7. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 1, 65 dadurch gekennzeichnet, daß sie als Antikörper (b)

mindestens einen Anti-IL2R β -Antikörper enthält, wobei das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:1000 bis 10:1 ist.

8. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ ID NO. 9 und 10 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
9. Antikörperzusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (a) und (b) murine, humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sind.
10. Arzneimittel, das aus Komponenten (1) und (2) besteht, wobei die beiden Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert sein können, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (1) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen.
11. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel von 1:10 bis 10:1 ist.
12. Arzneimittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 1:5 bis 5:1 ist.
13. Arzneimittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 3:10 bis 3:1 ist.
14. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (a) die in SEQ ID NO. 1 und 2 oder die in SEQ ID NO. 3 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
15. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ ID NO. 5 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
16. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel von 1:1000 bis 10:1 ist.
17. Arzneimittel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in Seq. ID No. 9 und 10 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.
18. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet daß die Antikörper (a) und (b) murine, humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sind.
19. Verwendung einer Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eines

Arzneimittels nach einem der Ansprüche 10 bis 18 bei einer immunsuppressiven Therapie, insbesondere bei der Therapie nach Organ- oder Gewebe-transplantationen.

20. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für eine immunsuppressive Therapie, insbesondere für die Therapie nach Organ- und Gewebetransplantationen, worin man ein aus Komponenten (1) und (2) bestehendes Arzneimittel bereitstellt, dessen beide Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert werden können, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (1) einen stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Antikörper (b) einen Anti-IL2R α -Antikörper verwendet, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) von 1:10 bis 10:1 ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Antikörper (b) einen Anti-IL2R β -Antikörper verwendet, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) von 1:1000 bis 10:1 ist.

23. Verfahren zur immunsuppressiven Therapie, insbesondere für die Therapie nach Organ- und Gewebstransplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 18 verabreicht.

35

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

SEQ ID NO: 1 (Leichte Kette Klon 151, anti CD4 MAK MT 15.1)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLAENGE: 381 Basenpaare

MERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
 aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
 von aa 96 (Tyr) bis aa 107 (Lys) J2-Region

ATG	ATG	TCC	TCT	GCT	CAG	TTC	CTT	GGT	CTC	CTG	TTG	CTC	TGT	TTT	CAA	48
Met	Met	Ser	Ser	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Gln	
-20						-15									-5	
GGT	ACC	AGA	TGT	GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	ATA	TCC	TCC	CTC	TCT	96
Gly	Thr	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	
					1				5					10		
GCC	TCT	CTG	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	AGT	TGC	AGG	GCA	AGT	CAG	GAC	144
Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	
					15			20						25		
ATT	AAC	AAT	TAT	TTA	AGC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT	192
Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	
					30			35						40		
AAA	CTC	CTG	ATC	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAT	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	240
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
					45			50			55				60	
AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	ACC	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	
					65				70						75	
AAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	GTT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAT	336
Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	
					80			85						90		
ACG	CTT	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA		
Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
					95			100						105		

SEQ ID NO: 2 (Schwere Kette Klon 151; anti CD4 MAK MT 15.1)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 417 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) Beginn der V-Region
von aa 108 (Asp) bis aa 120 (Ser) J4-Region

ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CTT TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT	48
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
-15	-10
	-5
ATC CAA GCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG ACG	96
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Thr	
1	5
	10
CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTC	144
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15	20
	25
ACA GAC TAT TCA ATA CAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGG AAG GAT TTA	192
Thr Asp Tyr Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu	
30	35
	40
	45
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACT GAG ACT GGT GAG CCA ACA TAT GCA	240
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala	
50	55
	60
GAT GAC TTC ACG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC	288
Asp Asp Phe Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser	
65	70
	75
ACT GTC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG TCT ACA	336
Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ser Thr	
80	85
	90
TAT TTC TGT ATT CAT TAC TAC GCC TAC GGG GAT CCT TTG GAC TAC	384
Tyr Phe Cys Ala Ile His Tyr Tyr Ala Tyr Gly Asp Pro Leu Asp Tyr	
95	100
	105
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA	
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110	115
	120

SEQ ID NO: 3 (Leichte Kette Klon 310, anti CD4 MAK MT 3.10)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 393 BasenpaareMERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
von aa 101 (Thr) bis aa 111 (Lys) J1-Region

ATG GAG ACA GAC ACA ATC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
-20 -15 -10 -5	
GGC TCC ACT GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG CCT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro	
1 5 10	
ATG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT	144
Met Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser	
15 20 25	
CTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA	192
Leu Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
.30 .35 .40	
GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AAT CTA GAA TCT	240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
45 50 55 60	
GGG ATC CCA GCC AGA TTT AGT GGC AGT GGG TCC GGG ACA GAC TTC ACC	288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT	336
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
80 85 90	
CAG CAA AGT AGT GAG GAT CCT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG	384
Gln Gln Ser Ser Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu	
95 100 105	
GAA ATC AAA	
Glu Ile Lys	
110	

SEQ ID NO: 4 (Schwere Kette Klon 310, anti CD4 MAK MT 3.10)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 411 BasenpaareMERKMALE: aa -18 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) Beginn der V-Region
von aa 107 (His) bis aa 118 (Ala) J3-Region

ATG	GAA	TGG	AGG	ATC	TTT	CTC	TTC	ATC	CTG	TCA	GGA	ACT	GCA	GGT	GTC	48
Met	Glu	Trp	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	
-15								-10							-5	
CAC	TCC	CAG	GTT	CAC	CTG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT		96
His	Ser	Gln	Val	His	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	
1						5					10					
GGG	CCT	TCA	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACA	TTC	ACT	144
Gly	Pro	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
15	.				20				25						30	
GAC	TAT	GTT	GTA	AGT	TGG	ATG	CAA	CAG	AGA	ACT	GGA	CAG	GTC	CTT	GAG	192
Asp	Tyr	Val	Val	Ser	Trp	Met	Gln	Gln	Arg	Thr	Gly	Gln	Val	Leu	Glu	
35									40						45	
TGG	ATT	GGA	GAG	ATT	TAT	CCT	GGA	AGT	GGT	AGT	GCT	TAT	TAC	AAT	GAA	240
Trp	Ile	Gly	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	
50								55							60	
AAA	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ATA	CTG	ACT	GCA	GAG	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	288
Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	
65								70							75	
GCC	TAC	ATG	GAG	TTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TTT	336
Ala	Tyr	Met	Glu	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Phe	
80							85								90	
TTC	TGT	GCA	AGA	CGG	GGG	GAT	GGT	TCC	CTC	GGC	TTT	GCT	CAC	TGG	GGC	384
Phe	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	His	Trp	Gly	
95							100								105	
CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	GCT	GCA								
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Ala								
110							115									

SEQ ID NO: 5 (Leichte Kette Klon 179, anti IL2R MAK 179)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 381 BasenpaareMERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
von aa 96 (Arg) bis aa 107 (Lys) J1-Region

ATG ATG GTC CTT GCT CAG TTT CTT GCA TTC TTG TTG CTT TGG TTT CCA	48		
Met Met Val Leu Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro			
-20	-15	-10	-5
GGT GCA AGA TGT GAC ATC CTG ATG ACC CAA TCT CCA TCC TCC ATG TCT	96		
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser			
1	5	10	
GTA TCT CTG GGA GAC ACA GTC AGC ATC ACT TGC CAT GCA AGT CAG GGC	144		
Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly			
15	20	25	
ATC AGA AGT AAT ATA GTG TGG TTG CAG CAG AAA CCA GGG AAA TCA TTT	192		
Ile Arg Ser Asn Ile Val Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe			
30	35	40	
AGG GGC CTG ATC TAT CAT GGA ACC AAG TTG GAA GAT GGA GTT CCA TCA	240		
Arg Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser			
45	50	55	60
AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGA GCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC	288		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	
AGC CTG GAA TCT GAA GAT TTT GCA GAC TAT TAT TGT GTA CAG TAT GCT	336		
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala			
80	85	90	
CAG TTT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA			
Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
95	100	105	

SEQ ID NO: 6 (Schwere Kette Klon 179, anti IL2R MAK 179)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 396 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) Start der Signalsequenz
 aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
 von aa 99 (Asp) bis aa 102 (Asn) D-Region
 von aa 103 (Trp) bis aa 113 (Ala) J3-Region

ATG GAC TCC AGG CTC AAT TTA GTT TTC CTT GTC CTT ATT TTA AAA GGT	48
Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly	
-15	-5
GTC CAG TGT GAT GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG CAG	96
Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
1	5
CCT GGA GGG TCC CGG AAA CTC TCC TGT GTT GCC TCT GGA TTC ACT TTC	144
Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
15	20
AGT ACC TTT GGA ATG CAC TGG GTT CGT CAG GCT CCA GAG AAG GGG CTG	192
Ser Thr Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu	
30	35
AGT TGG GTC GCA TAC ATT AGT AGT GGC AGT GGT ACC ATC TAC TAT GCA	240
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ala	
50	55
55	60
GAC ACA GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT CCC AAG AAT	288
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn	
65	70
70	75
ACC CTG TTC CTG CAA ATG ACC AGT CTA AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG	336
Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met	
80	85
85	90
TAT TAC TGT GCA AGA GAT TGG ATG AAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Trp Met Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
95	100
100	105
ACT GTC TCT GCA	
Thr Val Ser Ala	

SEQ ID NO: 7 (Leichte Kette Klon 215, anti IL2Ra MAK M-215)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein
 SEQUENZLAENGE: 435 Basenpaare

MERKMALE: aa -22 (Met) : Start der Signalsequenz
 aa 1 (Lys) : Beginn der V-Region
 von aa 95 (Phe) bis aa 106 (Lys) J4-Region
 ab aa 107 (Arg) : Beginn der C-Region

ATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA	48		
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser			
-20	-15	-10	
GTC ATA ATG TCC AGA GGC AAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC	96		
Val Ile Met Ser Arg Gly Lys Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile			
-5	1	5	10
CTG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC	144		
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser			
15	20	25	
TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC	192		
Ser Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser			
30	35	40	
CCC AAA CCC TGG ATT CAA GCC ACA TCC AAC CTG GCT TTT GGA GTC CCT	240		
Pro Lys Pro Trp Ile Gln Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro			
45	50	55	
TCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC	288		
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
60	65	70	
AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG	336		
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp			
75	80	85	90
AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATG AAA	384		
Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys			
95	100	105	
CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG	432		
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
110	115	120	
CAG 435			
Gln			

SEQ ID NO: 8 (Schwere Kette Klon 215, anti IL2R α MAK M-215)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 549 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) : Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) : Beginn der V-Region
von aa 98 (Thr) bis aa 104 (Ser) D-Region
von aa 105 (Trp) bis aa 119 (Ala) J3-Region
ab aa 120 (Ala) : Beginn der C-Region

ATG GCT GTG CTG GGG CTG CTT CTC TGC CTG GTG ACT TTC CCA AGC TGT	48		
Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys			
-15	-10	-5	
GTC CCG TCC CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGG CCT GGC CTG GTG GCG	96		
Val Pro Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala			
1	5	10	
CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACC GTC TCA GGG TTC TCA TTA	144		
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu			
15	20	25	
AGT ACC TAT AGT GTA TAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG	192		
Ser Thr Tyr Ser Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu			
30	35	40	45
GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG AGT GAT GGA AGC ACA ACC TAT AAT TCA	240		
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser			
50	55	-	60
ACT CTC AAA TCC AGA CTG ACC ATC AGC AAG GAC AAC TCC AAG AGT CAA	288		
Thr Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln			
65	70	75	
GTT TTC TTA AAA GTG AAC AGT CTC CAA ACT GAT GAC ACA GCC ATG TAC	336		
Val Phe Leu Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr			
80	85	90	
TAC TGT GCC AGA ACC TAT GGT TAT GAC GGG TCC TGG CTT GCT TAC TGG	384		
Tyr Cys Ala Arg Thr Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp			
95	100	105	
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCC AAA ACA ACA CCC CCA	432		
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro			
110	115	120	125
TCA GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGG TGT GGA GAT ACA ACT GGT TCC TCC	480		
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser			
130	135	140	
GTG ACT CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAC TTC CCT GAG TCA GTG ACT	528		
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr			
145	150	155	
GTG ACT TGG AAC TCT GGA TCC	549		
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser			
160			

SEQ.ID.NO.: 9 (leichte Kette Klon A23A41, anti IL2R β MAK A41)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 322 bp

MERKMALE: aa 1-96 V-Region

aa 97-107 J-Region

bp 322 erstes Basenpaar der C-Region

GAC GTC TTG CTG ACT CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCC GTG AGT CCA GGA	48
Asp Val Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
GAA AGA GTC AGT TTC TCC TGT AGG GCC AGT CAG AGC ATT GGC ACA AGC	96
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser	
20 25 30	
ATA CAC TGG TAT CAG CAA AGA ACA AAT GGT CCT CCA AGG CTT CTC ATA	144
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Pro Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
AAG TAT GCG TCT GAG TCA ATC TCT GGG ATC CCT TCC AGG TTT AGT GGC	192
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTT ACT CTT AGC ATC AGC AGT GTG GAG TCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Ser	
65 70 75 80	
GAA GAT ATT GCA GAT TAT TAC TGT CAA CAA ACT AAT AGC TGG CCA ACC	288
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Thr	
85 90 95	
ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATT AAA C 322	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

SEQ.ID.NO.: 10 (Schwere Kette Klon A23A41, anti IL2R β MAK A41)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 355 bp

MERKMALE: aa 1-98 V-Region

aa 99-104 D-Region

aa 105-118 J-Region

bp 355 erstes Basenpaar der C-Region

GAG GTC CAG CTG CAA CAG TTT GGA GCT GAA TTG GTG AAG CCT GGG ACT	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr	
1 5 10 15	

TCG GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ATT TTC ACT GAC TAC	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	

AAC ATG GAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAG TGG ATT	144
Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

GGA GAT ATT GAT CCT AAC TTT GAT AGT TCC AGT TAC AAC CAG AAG TTC	192
Gly Asp Ile Asp Pro Asn Phe Asp Ser Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	

AAG GGA AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AAC ACA GCC TAC	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCA GTC TAT TAC TGT	288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

GCA AGA GGG GGA TTC CCC TAT GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC	336
Ala Arg Gly Gly Phe Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	

TCA GTC ACC GTC TCC TCA G 355	
Ser Val Thr Val Ser Ser	
115	